

31 10 070
14 00 30 7/02
7. Mai 1981
25. November 1982

① BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

② Offenlegungsschrift
③ DE 31 18 072 A1

④ Int. Cl. 8
B 01 D 17/04
B 01 D 11/00
B 01 J 13/00

⑤ Abstraktion
⑥ Anmeldung
⑦ Offenlegungsgesetz

P 31 10 072 A
7. 5. 81
25. 11. 82

DE 31 18 072 A1

⑧ Anmelder:

Novak, Claus-Christian, Dr. rer. nat., Dr. med., 6951
Wiesbaden, DE

⑨ Erfinder:

gleiches Anmelder

⑩ Nachforschungsgebiete gem. § 48 Abs. 1 Satz 1 PatG:

DE-48 23 04 000
DE-48 12 27 117
US 23 45 000

DE-48: Römig, Chemie-Lexikon, 7. Auflage, 1973.

Seite 1002 bis 1005.

US-2: Journal of the American Oil Chemists Society Vol. 53,

1976, Seiten 28 bis 35.

BEST COPY AVAILABLE

⑪ Verfahren zur Trennung von flüchtigen Bestandteilen aus wässrigen Rohöl-Lösungen zu präparativen Zwecken
entsprechend dem Stand der Technik eines Analytischen Verfahrens

Es wird ein Verfahren zur Extraktion flüchtiger Bestandteile aus wässrigen Rohöl-Lösungen beschrieben. Das Verfahren besteht aus folgenden Schritten: a) Die physikalischen und chemischen Eigenschaften, insbesondere auch der spezifischen Wärme in der wässrigen Lösung, werden durch einen qualitativen und quantitativen Nachweis einer oder mehrerer Komponenten festgestellt. Das Extraktionsverfahren beruht auf der Verwendung von Mischungen organischer Lösungsmittel mit einer wasserunlöslichen Komponente, die eine Oberflächenspannung < 25 dyn/cm hat, und einer Komponente mit geringer Wasserlöslichkeit und einer Oberflächenspannung < 20 dyn/cm. Der Anteil der wasserunlöslichen Komponente beträgt 50 bis 90 Vol.-% der Lösungsmischung. Nachfolgend wird bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion aus wässrigen Lösungen organischer Bestandteile auch in ungetrennten Zuständen der wässrigen Phase - im Gegensatz zu den bisher bekannten Extraktionsverfahren - keine Zentrifugation eingesetzt, in der wässrige flüssige Anteile mit organischen Extraktanten präzipitiert und getrennt werden.

(21 10 072)

DE 31 18 072 A1

DRUCKSTÄRKE: 1000 0.0 200000 0.0

BEST AVAILABLE COPY

1/84

DE 3118072 A1

3118072

23.11.81

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von fettlöslichen Stoffen aus wässrigen Kolloidlösungen, dadurch gekennzeichnet, daß man einer lipophilen Substanzen enthaltenden Kolloidlösung eine Mischung aus einem wasserunlöslichen organischen Lösungsmittel mit einer Oberflächenspannung < 25 dyn pro cm und einem organischen Lösungsmittel mit geringer Wasserlöslichkeit und/oder einer Oberflächenspannung < 20 dyn/cm zufügt, die beiden Flüssigphasen miteinander durch Schütteln durchmischt und anschließend voneinander trennt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die organische Lösungsmittelphase ein geringeres oder höheres spezifisches Gewicht als die wässrige Phase hat.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als wasserunlösliches organisches Lösungsmittel mit geringer Oberflächenspannung ein Aliphater, ein aliphatischer Äther oder Thioäther mit 6 oder mehr Kohlenstoffatomen, ein Halogenkohlenstoff oder Halogenkohlenwasserstoff mit einer Oberflächenspannung < 25 dyn/cm (gegen Dampf oder Luft) für die Lösungsmittelmischung verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittelkomponente mit geringer Wasserlöslichkeit und/oder geringer Oberflächenspannung (< 20 dyn/cm gegen Dampf oder Luft) ein Alkohol mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein primäres, sekundäres oder tertiäres Amin mit 4 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein aliphatischer Monoalkyläther von Äthylenglykol mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, ein Dialkyläther von Diäthylenglykol mit 8 bis 16 Kohlenstoffatomen oder Mischungen derselben verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Volumenanteil der wasserunlöslichen Komponente 50 bis 90% der organischen Lösungsmittelmischung beträgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Vermischen einer wässrigen Kolloidlösung mit der organischen Lösungsmittelmischung zwischen dem Frostpunkten und dem Siedepunkten der Flüssigphasen erfolgt.

3118072

23.11.61

- 2 -

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei Kolloidlösungen biologischer Herkunft das Vermischen der wässrigen Lösung mit der organischen Lösungsmittel-mischung bei einer Temperatur zwischen 4°C und 60,5°C, günstigenfalls zwischen 20°C und 31°C erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Durchmischung der Lösungen manuell oder automatisch erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach Durchmischung die Phasentrennung der Lösungen nach einem
- 10 Verfahren erfolgt, das die unterschiedlichen spezifischen Dichten der Phasen berücksichtigt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Abtrennen der Phasen manuell oder automatisch erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die wässrige einen Analyt enthaltende Phase zu analytischen
- 15 oder präparativen Zwecken weiterverarbeitet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Aufarbeitung von Flüssigkeiten biologischer Herkunft ein chemischer, biologischer, biochemischer oder immunolo-
- 20 gischer Nachweis eines Analyts in der delipidierten wässrigen Phase ausgeführt wird.

81

3118072

23.11.81

Verfahren zur Trennung von lipophilen Bestandteilen aus wässrigen Kolloid-Lösungen zu präparativen Zwecken und/oder zum Nachweis eines Analyts in wässriger Phase

- 5 Zahlreiche Stoffe, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen, die jedoch in wässrigem Medium unlöslich sind, können in Form einer Emulsion, d.h. in Gegenwart von niedermolekularen und/oder hochmolekularen Verbindungen mit amphiphilen Eigenschaften dennoch in der wässrigen Phase in Lösung gebracht werden. Insbesondere bei Naturstoffen, aber auch bei synthetischen Produkten können lipophile Stoffe (z.B. Neutralfette, fettlösliche Farbstoffe) die Weiterverarbeitung von hydrophilen Substanzen in der wässrigen Phase beeinträchtigen.
- 10 Sie müssen daher zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung beseitigt werden. Verschiedene Verfahren sind entwickelt worden, die eine Extraktion von lipophilen Stoffen aus stabilen wässrigen, polymerhaltigen Lösungen ermöglichen (z.B. Extraktion mit Chloroform/Methanol bzw. Äthanol;
- 20 Isopropyläther/Butanol; Halogenkohlenwasserstoffen; Äther/Methanol bzw. Äthanol). Diese Verfahren erweisen sich jedoch für die Untersuchung und/oder Verarbeitung eines wasserlöslichen Polymers, das sich durch seine Eigenschaften als Detergens auszeichnet, als unzureichend, denn typische in der wässrigen Phase erhaltene Merkmale des Analyten werden durch diese Behandlung beseitigt. In der Biochemie wird der Verlust dieser Merkmale als "Denaturierung" bezeichnet.
- 30 Häufig ist hingegen eine Beseitigung von störenden lipophilen Bestandteilen aus der wässrigen Kolloidlösung unter der Erhaltung der physikochemischen und/oder biologischen Eigenschaften eines Analyten in der wässrigen Phase zum Zwecke der weiteren Aufarbeitung notwendig. In einzelnen Fällen hat sich eine Extraktion der Lipide in einem
- 35 Zweiphasensystem als geeignet erwiesen: z.B. Äther/Wasser;

Halogenkohlenwasserstoffe bzw. Halogenkohlenstoffe/
Wasser). Bei wässrigen Kolloiddösungen, die lipophile
Bestandteile enthalten, ist jedoch bei diesen Verfahren
eine ausreichende Durchmischung der Flüssigphasen nicht
5 gewährleistet. Darüberhinaus bildet sich eine Zwischen-
phase, in der sich insbesondere ein Analyt mit Deter-
gentieneigenschaften anreichert. Er wird dadurch dem
wässrigen Medium für den Nachweis und/oder die weite-
re Verarbeitung entzogen. Ein Zusatz von neutralen Deter-
10 gentien (z.B. Polyäthylenoxyderivaten) oder anionischen
Seifen kann die Anreicherung von Polymeren wie z.B. Pro-
teinen in der Zwischenphase nicht verhindern.

Überraschender Weise wurde festgestellt, daß eine Vorbe-
handlung von wässrigen kolloidalen Lösungen, die lipo-
15 phile Bestandteile in emulgierter Form enthalten, mit einer
Mischung eines wasserunlöslichen organischen Lösungsmit-
tels mit geringer Oberflächenspannung (< 25 dyn/cm gegen
Dampf oder Luft) und einem niedermolekularen organischen
Lösungsmittel mit nur geringer Wasserlöslichkeit, aber
20 die Oberflächenspannung des Wassers stark herabsetzenden
Eigenschaften eine Beseitigung der Lipide aus der wäs-
srigen Kolloiddlösung in einem Ausmaß ermöglicht, das bei
ausschließlicher Verwendung eines wasserunlöslichen
organischen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches
25 nicht erreicht werden kann. Darüberhinaus wurde fest-
gestellt, daß unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches
mit den angegebenen Eigenschaften keine Phase zwischen
der wässrigen und der organischen Phase ausgebildet wird,
in der ein gegebenenfalls zu untersuchender polymerer
30 Analyt sich anreichert. Ferner ergab sich, daß die biologi-
schen und/oder physikochemischen Eigenschaften eines zu
untersuchenden Analyts in der wässrigen Phase erhalten
bleiben und somit einem z.B. immunologischen oder biolo-
gischen Nachweis zugänglich sind, ohne daß ursprünglich
35 in der wässrigen Kolloiddlösung vorhandene lipophile Sub-
stanzen den Nachweis störend beeinflussen.

3118072

23.11.81

Im Vergleich zu den erwähnten herkömmlichen Methoden zeichnet sich das Verfahren dadurch vorteilhaft aus, daß es in Anbetracht der nur geringen Mengen der zu verwendenden Lösungsmittelgemische für eine Aufarbeitung von Kolloidlösungen weitersparend und weniger arbeitsintensiv ist, da sich für die weitere Aufarbeitung eines Analyten in der wässrigen Phase eine Beseitigung von organischen Lösungsmittelbestandteilen erübrigt.

10 Folgende organische Lösungsmittel mögen als Vertreter ihrer Verbindungsklasse aufgeführt sein:

I. Organische Lösungsmittel mit geringer Löslichkeit in wässrigem Medium und niedriger Oberflächenspannung

(< 0 dyn/cm)

15	$C_n H_{2n+m} - OH$	$n: 5-10; m: 0$ oder 2
	$C_n H_{2n+m} - NH_2$	$n: 4-12; m: 0$ oder 2
	$(C_n H_{2n+m})_2 NH$	$n: 3-6; m: 0$ oder 2
	$(C_n H_{2n+m})_3 N$	$n: 3-6; m: 0$ oder 2
	$(C_n H_{2n+m} - O - CH_2 CH_2 -)_2 O$	$n: 2-6; m: 0$ oder 2
20	$C_n H_{2n+2} - (O - CH_2 CH_2)_2 - OH$	$n: 3-6; m: 0$ oder 2
	$C_n H_{2n+2} - CO - C_m H_{2m+2}$	$n: 1-3; m: 3-6$

II. Wasserunlösliche organische Lösungsmittel mit niedriger Oberflächenspannung (< 25 dyn/cm)

25

Fluor-Chlorkohlenstoffe und Fluor-Chlorkohlenwasserstoffe
Aliphate
aliphatische Äther und Thioäther mit 6 oder mehr Kohlenstoffatomen

30

3118072

20.11.81

6

Folgende Beispiele mögen den Vorteil des neuentwickelten Verfahrens verdeutlichen:

Beispiel :

- 5 Jeweils 0,5 ml Serum werden 10 Minuten mit 1ml des organischen Lösungsmittels a bzw. der Lösungsmittelmischungen b bis e geschüttelt. Anschließend wird zentrifugiert und aus der wässrigen Phase die Lipidkonzentration gemessen. Die Ergebnisse zeigen, daß bei alleiniger Verwendung des
- 10 Fluor-Chlorkohlenstoffpolymer als organisches Lösungsmittel eine unzureichende Lipidextraktion erreicht wird. Bei der Verwendung der angegebenen Lösungsmittelgemische (in Vol. Teilen) wird hingegen eine Extraktion von Triglycerid bzw. Cholesterin bis zu 98%, für Phospholipid bis zu 85%
- 15 erreicht
- a. Fluor-Chlorkohlenstoffpolymer (Frigen 113 Polymer)
- b. Cyclohexanol/Frigen 113 Polymer (25/75)
- c. n-Hexanol /Frigen 113 Polymer (25/75)
- d. 1-Heptanol/Frigen 113 Polymer (25/75)
- 20 e. 2-Heptanol/Frigen 113 Polymer (25/75)

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
Serum nativ	1070	510	356
25 " a. Extraktion a	510	234	164
" " b	34	-	98
" " c	34	10	55
" " d	36	13	65
" " e	34	13	84

30

3118072

23.11.61

7

Beispiel 2

Extraktion von Lipiden in wässriger Kolloiddlösung mit anderen als in Beispiel 1 angegebenen Lösungsmittelmischungen. 0,5 ml Serum wird mit 0,7 ml eines

- 5 organischen Lösungsmittels bzw. einer Lösungsmittelmischung in der gleichen Weise behandelt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Ergebnisse zeigen den wesentlich höheren Effekt der angegebenen Lösungsmittelgemische bei der Lipidextraktion gegenüber den reinen wasserunlöslichen
- 10 Lösungsmitteln. Die in Klammern angegebenen Quotienten kennzeichnen das Mischungsverhältnis der Volumina der einzelnen Lösungsmittelkomponenten.

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
15 Serum nativ	653	290	351
Serum + CF_3CCl_3	151	101	80
Serum + Frigen 113 Pol.	107	61	109
Serum + CF_3CCl_3 /			
n-Hexylamin (95/5) 12		16	21
20 " + CF_3CCl_3 /Diäthylenglycolmonobutyläther (80/20) 17		17	29
" + CF_3CCl_3 /n-Hexanol (75/25) 33		24	41
25 " + CF_3CCl_3 /Diäthylenglykoldiäthyläther (95/5) 92		57	138
" + Frigen 113 Polym./n-Hexylamin (95/5) 17		13	20
30 " + Frigen 113 Polym./Diäthylenglykolmonobutyläther (80/20) 6		15	51
" + Frigen 113 Polym./n-Hexanol (75/25) 31		20	80
35 " + Frigen 113 Polym./Diäthylenglykoldiäthyläther (80/20) 42		53	81

*geringfügige Niederschlagsbildung in der Zwischenphase

3118072

Beispiel 3

Extraktion von Lipiden in Flüssigphase mit Hilfe weiterer Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische. Das Mischungsverhältnis beträgt 0,3 ml Serum und 0,7 ml organisches Lösungsmittel. Die in Klammern angegebenen Quotienten kennzeichnen das Mischungsverhältnis der Volumina der organischen Lösungsmittelkomponenten. Die Tabelle veranschaulicht den deutlich wirksameren Effekt der Lipidextraktion bei der Verwendung der angegebenen Lösungsmittelgemische.

	Triglycerid (mg/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
Serum nativ	171	185	88
15 Serum + n-Hexan *	170	180	84
Serum + Diisopropyläther *	122	161	51
Serum + n-Hexan/n-Heptylamin (95/5)	3	1	0
Serum + Diisopropyläther/ n-Heptylamin (95/5)	8	11	0
20 Serum + n-Hexan/Diäthylengly- kolmonohutyliäther (90/10)	0	1	12
Serum + Diisopropyläther/Di- äthylmonobutyliäther (90/10)	0	1	0
25 Serum + CF_3CCl_3 /n-Octylamin (95/5)	0	1	10
Serum + CF_3CCl_3 /n-Heptylamin	34	36	18

30 * geringfügige Eiweißprecipitation in der Zwischen-Phase

3118072

Beispiel 4

Nachweis der Erhaltung der immunochemischen Eigenschaften eines komplexgebundenen antigenen Mißpolymeren nach einer Delipidierung in Flüssigphase.

- 5 0,1 ml einer Lösung eines aus menschlichem Serum isolierten Lipoproteins (High Density Lipoprotein ,HDL) wurden mit 0,3ml eines organischen Lösungsmittels nach Beispiel 1 ,Extraktionsverfahren a bzw. b 10 min im Schüttelautomaten geschüttelt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation in einer
- 10 Labozentrifuge getrennt. 20 µl der wässrigen Phase wurden mit 2ml 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden mit einem Antiserum gegen Apolipoprotein A1,einem Proteinbestandteil der HDL,gemischt.Die Lichtstreuung der sich bildenden Immunkomplexe mit Apolipoprotein A1 wurde über einen
- 15 Zeitraum von 2 Std. mit Hilfe eines Laser-Nephelometers gemessen.
- Die Messung ergab,daß die Reaktion mit nativer HDL,in der der antigene Analyt mit Lipid assoziiert ist,wesentlich langsamer verläuft als nach einer Delipidierung nach dem Extraktionsverfahren b.Die Vorbehandlung der Probe nach dem Extraktionsverfahren a führte zum gleichen Ergebnis im immunochemischen Nachweis wie im Falle der unbehandelten Probe.Während nach der Lipidextraktion nach Verfahren b das Maximum des immunnephelometrischen Signals nach 90 min erreicht ist,ist die Immunreaktion
- 20 nach Extraktion nach dem Verfahren a nach 2 Std.noch nicht beendet.

© BUNDESREPUB
DEUTSCHLAND



DEUTSCHE
PATENTAMT

① Anmelder:
Hoechst AG, 65926 F.

② Erfindungsgegenstand:
Verfahren zur Delipidierung von
Protein-Lipid-Komplexen (1)

Es werden 10 µl einer Lösung aus HDL, Apolipoprotein A1, Antiserum gegen Apolipoprotein A1 und 0,3 ml eines organischen Lösungsmittels in einem Schüttelautomaten geschüttelt. Die Phasen werden durch Zentrifugation in einer Labozentrifuge getrennt. 20 µl der wässrigen Phase werden mit 2 ml 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung werden mit einem Antiserum gegen Apolipoprotein A1 gemischt. Die Lichtstreuung der sich bildenden Immunkomplexe wird über einen Zeitraum von 2 Std. mit Hilfe eines Laser-Nephelometers gemessen.

DE 3118072 A1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.